



Veronika Ölschläger (Autor)

**Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zum Einfluss von Partikellänge und Konzentratanteil auf Parameter der fibrolytischen Pansenverdauung**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1604>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 Wichtigste Fütterungsfaktoren, die den Faserabbau im Pansen beeinflussen	3
2.1.1 Beeinflussung der Abbaurate	3
2.1.1.1 Morphologische, kristalline und physikalische Natur der Faser	3
2.1.1.2 Ruminaler pH-Wert	4
2.1.1.3 Ruminale Pufferkapazität	6
2.1.2 Beeinflussung der Lag-Phase	6
2.1.3 Beeinflussung des potentiellen Ausmaßes der Verdauung und der Passagerate	7
2.1.3.1 Partikelgröße und -dichte	8
2.1.3.1.1 Krafftutterniveau	9
2.1.3.2 Futteraufnahme	9
2.2 Chemie und Biochemie der Faser	10
2.2.1 Chemische Bestandteile der Faser	10
2.2.1.1 Zellwandkohlenhydrate	10
2.2.1.1.1 Cellulose	10
2.2.1.1.2 Hemicellulosen	11
2.2.1.1.2.1 Pentosane	11
2.2.1.1.2.2 Hexosane	12
2.2.1.1.3 Pectinstoffe	12
2.2.1.1.4 Zellwandproteine	13
2.2.2 Veränderungen der Zellwand im Laufe des Pflanzenwachstums	14
2.2.2.1 Primärwand	14
2.2.2.2 Sekundärwand	15
2.2.2.3 Tertiärwand	17
2.3 Faserabbauende Mikroorganismen im Pansen	17
2.3.1 Faserabbauende Protozoen und Pilze	18
2.3.2 Cellulolytische Bakterien	19
2.3.2.1 Fibrobacter succinogenes	20
2.3.2.2 Cellulolytische Kokken	21
2.3.2.2.1 Ruminococcus flavofaciens	21
2.3.2.2.2 Ruminococcus albus	21
2.3.2.2.3 Populationsgrößen der drei Haupt-Cellulolytenarten	22
2.3.3 Anheftung an Partikel	22
2.3.4 Adhäsionsmechanismen	24

2.3.4.1 Das Cellulosom cellulolytischer Bakterien	24
2.3.5 Zeitraum und Bedingungen der Anheftung	27
2.3.6 Einfluss von Kraftfutter und Partikellänge	27
2.4 Enzyme im Pansen	28
2.4.1 Verteilung der Enzyme im Pansen	28
2.4.2 Fütterungs- und zeitbedingte Unterschiede der Enzymaktivität	29
2.4.3 Von Mikroorganismen gespaltene Bindungen	30
2.5 Interaktionen zwischen Mikroorganismen im Pansen	30
2.5.1 Positive Effekte für Bakterien	31
2.5.1.1 Interaktionen zwischen Bakterien	32
2.5.1.1.1 Synergismus beim Abbau von Strukturkohlenhydraten	32
2.5.1.1.2 Endproduktformation	32
2.5.1.2 Interaktionen zwischen Bakterien und Pilzen	33
2.5.2 Negative Effekte für Bakterien	33
2.5.2.1 Interaktionen zwischen Bakterien	33
2.5.2.1.1 Bakteriozine und Bakteriozin-ähnliche Substanzen	33
2.5.2.2 Interaktionen zwischen Bakterien und Protozoen	34
2.6 Methoden zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften im Pansen	34
2.6.1 Molekularbiologische Methoden in situ	34
2.6.2 16S rRNA-basierende Methoden	35
2.6.3 PCR	36
2.6.3.1 Real-time PCR	38
2.6.3.1.1 Detektion über DNA-interkalierende Farbstoffe	38
2.6.3.1.2 Detektion über Fluoreszenz-markierte Sonden	39
2.6.3.1.2.1 5'-Nuclease Assay	39
2.6.3.1.3 Ct-Wert (cycle threshold)	40
2.6.4 PCR-DGGE	40
2.6.4.1 Prinzip der DGGE	40
2.6.4.2 Vorteile und Anwendungsbereiche	42
2.6.4.3 Quantifizierungsmöglichkeiten der Artendiversität	43
2.6.4.3.1 Shannon-Index	43
2.6.4.3.2 Simpson-Index	44
2.6.5 Quantifizierung ruminaler faserabbauender Bakterien anhand molekularbiologischer Verfahren	44
2.6.5.1 Quantität faserabbauender Pansenbakterien in Abhängigkeit von der Ration	46
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>48</b>

3.1 Versuch 1	48
3.1.1 Tiere und Haltung	48
3.1.2 Fütterung und Futterzusammensetzung	48
3.1.3 Probennahme und Probenaufbereitung	51
3.2 Versuch 2	52
3.2.1 Tiere und Haltung	52
3.2.2 Fütterung und Futterzusammensetzung	53
3.2.3 Probennahme und Probenaufbereitung	55
3.3 Analysemethoden	55
3.3.1 Bestimmung der Aktivität NSP-spaltender Enzyme in der festen und flüssigen Phase des Pansens	55
3.3.1.1 DNSS-Test	55
3.3.1.2 Agardiffusionstest	57
3.3.1.2.1 Substratagar	57
3.3.1.2.2 Probenaufbereitung	58
3.3.1.2.3 Beladung der Agarplatten und Inkubation	58
3.3.1.2.4 Nachweis der Enzymaktivität, Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse	59
3.3.1.3 Zymogramme	59
3.3.1.3.1 SDS-PAGE	60
3.3.1.3.1.1 Gele und Substratlösungen	60
3.3.1.3.1.2 Probenvorbereitung und Elektrophorese	61
3.3.1.3.2 Native PAGE	61
3.3.1.3.2.1 Probenvorbereitung und Elektrophorese	62
3.3.1.3.3 Renaturierung und Inkubation der Gele	62
3.3.1.3.4 Anfärbung der Gele	62
3.3.1.3.5 Dokumentation	63
3.3.2 Real-time PCR	63
3.3.2.1 DNA-Extraktion aus Pansenproben	63
3.3.2.1.1 Zellyse	63
3.3.2.1.2 Extraktion der Nucleinsäuren	64
3.3.2.1.3 DNA-Reinigung (NucleoSpin <sup>®</sup> Tissue, Macherey-Nagel, Düren)	65
3.3.2.2 Herstellung von Kalibrierreihen für cellulolytische Keime	65
3.3.2.2.1 Kultivierung	66
3.3.2.2.2 Beimpfung der Kalibrierreihe	66
3.3.2.2.3 Extraktion der DNA aus den Kalibrierreihen	67
3.3.2.3 Real-Time PCR - Reaktionsansatz	67

3.3.3 PCR-DGGE	69
3.3.3.1 DNA-Extraktion	69
3.3.3.2 DGGE-PCR	69
3.3.3.4 Sequenz-spezifische Auftrennung der PCR-Amplikons	70
3.3.3.5 Silberfärbung und Entwicklung	71
3.3.3.6 Auswertung der Gele	72
3.4 Berechnungen und Statistische Auswertung	73
3.4.1 Versuch 1	73
3.4.2 Versuch 2	74
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>75</b>
4.1 Versuch 1	75
4.1.1 Einfluss der Partikellänge und des Kraftfutterniveaus auf die Aktivitäten kohlenhydratspaltender Enzyme	75
4.1.1.1 Aktivitäten kohlenhydratspaltender Enzyme	75
4.1.1.2 Qualitative Analytik mikrobieller Enzymaktivitäten	79
4.1.2 Quantifizierung der Gesamtbakterien und Cellulolyten	79
4.1.3 Einfluss von Kraftfutter und Partikellänge auf die mikrobielle Diversität	83
4.2 Versuch 2	88
4.2.1 Quantifizierung der Gesamtbakterien und Cellulolyten	88
4.2.2 Einfluss von Kraftfutter und Partikellänge auf die mikrobielle Diversität	91
<b>5. Diskussion</b>	<b>96</b>
5.1 Versuch 1	96
5.1.1 Agardiffusion	96
5.1.1.1 Methode	96
5.1.1.2 Enzymaktivitäten	97
5.1.1.2.1 Amylytische Enzyme	98
5.1.1.2.2 Cellulolytische Enzyme	99
5.1.1.2.3 Hemicellulolytische Enzyme	100
5.1.1.2.4 Pectinolytische Enzyme	101
5.1.2 Korrelation von Enzymen zu Pansenparametern	101
5.1.3 Zymogramme	107
5.1.4 PCR-Nachweis von Eubakterien und Ruminokokken	108
5.1.4.1 Methode	108
5.1.4.2 Bakterienzellzahlen	110
5.1.4.2.1 Größenordnung der ermittelten Zellzahl	110
5.1.4.2.2 Vergleich feste Digesta versus freie Flüssigkeit	110

5.1.4.2.3 Vergleich 1h vor versus 3h nach der Morgenfütterung	111
5.1.4.2.4 Beeinflussung der bakteriellen Zellzahl durch die vier Rationen	112
5.1.4.3 Anteil der cellulolytischen Bakterien an der Gesamtbakterienzahl	114
5.1.5 Korrelationen zwischen Bakterienzahlen und Pansenparametern	115
5.1.6 Korrelationen zwischen Bakterienzahlen und der Aktivität faserspaltender Enzyme	121
5.1.6.1 Einfluss der Partikellänge	122
5.1.6.2 Einfluss des Kraftfutterniveaus	124
5.1.7 PCR-DGGE	126
5.1.7.1 Methode	126
5.1.7.2 Auswertung der DGGE-Gele	128
5.1.7.2.1 Auswertung des gesamten Bandenmusters	128
5.1.7.2.2 Auswertung der dominanten Banden	129
5.2 Versuch 2	130
5.2.1 PCR	130
5.2.1.1 Methode	130
5.2.1.2 Bakterienzellzahlen	131
5.2.1.2.1 Größenordnung der ermittelten Zellzahl	131
5.2.1.2.2 Vergleich feste Digesta versus freie Flüssigkeit	131
5.2.1.2.3 Vergleich 1h vor versus 2h nach der morgendlichen Futtervorlage	132
5.2.1.2.4 Beeinflussung der Zellzahl durch die drei Partikellängen der Maissilage	133
5.2.1.3 Anteil der cellulolytischen Bakterien an der Gesamtbakterienzahl	134
5.2.2 Pearson-Korrelationen zwischen Bakterienzellzahl, Enzymaktivitäten und Pansenparametern	136
5.2.3 DGGE	140
5.2.3.1 Auswertung des gesamten Bandenmusters	140
5.2.3.2 Auswertung der dominanten Banden	140
<b>6. Allgemeines Fazit</b>	<b>142</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>146</b>
<b>8. Summary</b>	<b>149</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>
Abkürzungsverzeichnis	181
Tabellenverzeichnis	184
Abbildungsverzeichnis	187
Anhang	188
Danksagung	193
Lebenslauf	194